

Heidi Penttilä

# Protokollan pystyttäminen rotan plasmasta eristettyjen solunulkoisten vesikkeleiden karakterisointia varten

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

5.11.2015

|  |   |
|--|---|
| Tekijä<br>Otsikko  | Heidi Penttilä<br>Protokollan pystyttäminen rotan plasmasta eristettyjen solunulkoisten vesikkeleiden karakterisointia varten |
| Sivumäärä<br>Aika  | 26 sivua + 1 liite<br>5.11.2015   |
| Tutkinto   | Laboratorioanalyttikko (AMK)  |
| Koulutusohjelma  | Laboratorioalan koulutusohjelma   |
| Ohjaajat   | Tutkijatohtori Jenni Karttunen<br>Lehtori Tiina Soininen  |
| <p>Opinnäytetyön käytännön osuus suoritettiin A.I. Virtanen instituutille (AIVI) Kuopiossa. Työn tarkoitus on luoda protokolla solunulkoisten vesikkeleiden karakterisoinniseksi rotan plasmasta traumaperäisen epilepsian tutkimusryhmän julkaisuja ja tutkimustyön näytematriisin varmistusta varten.</p> <p>Solunulkoisten vesikkeleiden, eksosomien, karakterisoinnissa noudatetaan ISEV:n (International Society of Extracellular Vesicles) minimivaatimuksia. Karakterisoinnissa määritetään proteiiniprofiili ja proteiinikonsentraatio sekä todetaan solunulkoisille vesikkeleille spesifisiä proteiineja.</p> <p>Solunulkoisten vesikkeleiden karakterisointi on edellytys tieteellisen tutkimuksen osalta, jotta voidaan edetä biomarkkereiden ja jopa hoitokeinojen etsimiseen traumaperäiseen epilepsiaan. On tärkeää voida todistaa työskentelevänsä tarkoituksenmukaisella näytematriisilla.</p> <p>Opinnäytetyössä luotiin AIVI:lle toimiva, mutta vielä optimointia vaativa protokolla solunulkoisten vesikkeleiden karakterisointia varten. ISEV:n minimivaatimusten lisäksi pyrittiin saamaan mahdollisimman pienellä näytemäärällä suoritettava karakterisointiprotokolla. Valmiin protokollan avulla voidaan suorittaa tieteelliseen tutkimukseen ja julkaisuun kelpaava karakterisointi. Kun lopullinen optimointi on saatu tehtyä, voi tutkimusta jatkaa ja vertailla proteiiniprofiileja naiivi-, TBI- ja SHAM-eläinten välillä. Näin voitaisi epilepsiaryhmän hypoteesin mukaan nähdä eksosomiprofiilissa selkeä ero SHAM- ja TBI-eläimien eksosomiprofiilissa, verrattuna naiiviin ja toisiinsa. Näin ollen voidaan jatkossa kartoittaa proteiiniprofiilin muutoksista ja konsentraatiomuutoksista mahdollisia biomarkkereita traumaperäisen epilepsian syntymiselle.</p> |   |
| Avainsanat   | eksosomi, eristys, karakterisointi, solunulkoiset vesikkelit  |

|   |  |
|---|--|
| Author<br>Title   | Heidi Penttilä<br>Constructing a protocol to characterize extracellular vesicles extracted from rat plasma |
| Number of Pages<br>Date   | 26 pages + 1 appendix<br>5.11.2015   |
| Degree  | Bachelor of Laboratory Sciences  |
| Degree Programme  | Laboratory Sciences  |
| Instructors   | Jenni Karttunen, PhD<br>Tiina Soininen, Senior lecturer  |
| <p>The practical work of this thesis was done at A.I. Virtanen Institute of Molecular Sciences in Kuopio, Finland.</p> <p>The main objective of this thesis was to construct and test a working protocol to characterize extracellular vesicles (EV's) from rat plasma. In characterizing extracellular vesicles, or exosomes, minimum requirements of ISEV would be met. The characterization would include characterizing their size, protein concentration and composition, and proving the presence of extracellular vesicle specific proteins.</p> <p>Characterizing extracellular vesicles is a precondition for scientific research. After this the research can be continued to searching for biomarkers and even therapeutical agents for trauma-based epilepsy. It is critical to have a solid characterization protocol to prove you are working with the appropriate sample matrix.</p> <p>This thesis created a working protocol for characterizing extracellular vesicles. The protocol remains in need of optimizing. While creating the protocol to meet ISEV minimum criteria, a main goal was to reduce the sample size to a minimum while still being able to carry out the whole protocol with one sample. With this protocol, a characterization usable in scientific publications, can be made. When the final optimizing has been done, the research can be continued, and the comparison between naïve, TBI- and SHAM- operated animals can be started. According to the epilepsy research group's hypothesis, there should be a visible difference in in the exosome profile between the TBI- and SHAM-operated animals and between the TBI- and SHAM-operated animals and the naïve sample. Thus, in the future protein profile and concentration changes may lead to finding biomarkers for trauma-based epilepsy.</p> |  |
| Keywords  | exosome, extraction, characterization, extracellular vesicles  |

# Sisällys

## Lyhenteet

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Johdanto  | 1  |
| 2     | Solunulkoiset vesikkelit, eksosomit   | 2  |
| 2.1   | Eksosomien toteamisen vähimmäisvaatimukset  | 3  |
| 2.2   | Eksosomien eristys ja tutkiminen vasta-aineilla   | 4  |
| 2.2.1 | Flotillini 1  | 5  |
| 2.2.2 | CD9- proteiini  | 5  |
| 2.2.3 | Seerumialbumiini  | 6  |
| 2.2.4 | Kalneksiini   | 6  |
| 2.3   | Eksosomijakauman tutkiminen   | 6  |
| 2.3.1 | Toimintaperiaate  | 7  |
| 2.3.2 | Mittausolosuhteiden optimointi  | 8  |
| 3     | Menetelmät ja työn suoritus   | 9  |
| 3.1   | Näytteiden valinta  | 9  |
| 3.2   | Eksosomien eristys ja SDS-PAGE-analyysi;<br>Proteiiniprofiilin määrittäminen.                 | 10 |
| 3.3   | Western Blot -analyysi ja sen optimointi;<br>Spesifisten proteiinien detektointi detektointi. | 11 |
| 3.4   | Nano Sight (NTA) - analyysi;<br>Partikkelikokojakauman ja konsentraation määrittäminen.       | 12 |
| 4     | Tulokset  | 13 |
| 4.1   | Proteiinipitoisuuden määrittäminen  | 13 |
| 4.2   | SDS-PAGE -analyysin optimointi  | 14 |
| 4.3   | Western blot -analyysi  | 15 |
| 4.3.1 | Menetelmän optimointi   | 15 |
| 4.3.2 | Spesifiset vasta-aineleimaukset   | 17 |
| 4.4   | NTA-analyysi  | 20 |

|   |   |    |
|---|---|----|
| 5 | Päätelmät   | 22 |
|   | Lähteet   | 25 |
|   | Liitteet  |    |
|   | Liite 1. Characterization of Exosomes from rat plasma |    |

## Lyhenteet

|          |   |
|----------|---|
| AIVI     | A.I. Virtanen Institution of Molecular Sciences, A.I. Virtanen instituutti                          |
| EM       | elektronimikroskooppi   |
| In vivo  | elävässä organismissa/eläimessä tehty tutkimus TBI Traumatic Brain Injury, traumaperäinen aivovamma |
| ISEV     | International society of Extracellular Vesicles   |
| NTA      | Nanoparticle Tracking Analysis, nanopartikkelien jäljitykseen perustuva analyysi                    |
| SDS-PAGE | vertikaalinen geielektroforeesi jolla voidaan erotella proteiinit toisistaan koon perusteella       |
| SHAM     | Kontrollieläin <i>in vivo</i> - mallissa, samat toiminnot ilman aivovammaa suoritettu               |
| TEN      | Tris, EDTA ja NaCl puskuriliuos   |

## 1 Johdanto

Traumaperäisen aivovamman (Traumatic Brain Injury, TBI) saaneilla potilailla on 1,5 - 17-kertainen todennäköisyys sairastua traumaperäiseen epilepsiaan, riippuen aivovamman laadusta [1]. Näistä arvioiden mukaan korkeintaan 10 % sairastuu, penetroivien aivovammojen osalta määrä on suurempi [2]. Akuuttitilanteessa mitattavilla aivosähkökäyrillä (EEG) ei ole voitu ennustaa epilepsian puhkeamista aivovamman jälkeen, eikä sen seurauksena myöskään ennaltaehkäistä epilepsian syntymistä [2].

A.I. Virtanen instituutti (AIVI) on perustettu vuonna 1989. Instituutin pääpaino on biolääketieteellisessä tutkimuksessa, ja se on profiloitunut voimakkaasti molekyylibiolääketieteen tutkimukseen. AIV:ssä on yhteensä 14 tutkimusryhmää, joista yksi on professori Asla Pitkäsen johtama epilepsiatutkimusryhmä. Traumaperäisen epilepsian diagnostiikkaan, ennen varsinaisen sairauden puhkeamista, halutaan tutkijatohtori Jenni Karttusen tutkimuksessa löytää biomarkkereita, ja sitä kautta löytää uusi hoitomuoto, jolla sairauden puhkeaminen estetään tai sitä hidastetaan [3]. Karttusen tutkimuksen perustaksi tarvitaan protokolla, jolla *in vivo* - mallin TBI- ja kontrolli- (SHAM) rotan verestä eristetyt solunulkoiset vesikkelit, eksosomit, saadaan karakterisoitua ja osoitettua, että eristys on onnistunut. Tämä on jatkotutkimuksien kannalta välttämätöntä, että tiedetään työskentelyssä olevan haluttu näytematriisi, eksosomit. Protokollan luominen valikoituikin opinnäytetyön aiheeksi sen monimuotoisuuden ja haastavuuden vuoksi.

Opinnäytetyön pääpainona on saada selville solunulkoisten vesikkeleiden (eksosomien) kokojakauma, proteiinikonsentraatio ja proteiiniprofiili, sekä eksosomispesifisien proteiinien määrä. Opinnäytetyön perustana käytettiin tutkimuskysymyksiä:

- Miten voidaan detektoida yleisiä, proteiinikonsentraation ja proteiiniprofiilin eroavaisuuksia plasma- ja eksosominäytteiden välillä?
- Millä metodilla voidaan varmistua eksosomieristyksen onnistumisesta?

Eksosomit ovat yksi molekyylibiologian suurimpia mielenkiinnon kohteita ja juuri nyt monien tutkimusryhmien ja -aiheiden kohteena. Suuren mielenkiinnon ja nopean edistyksen vuoksi on vuonna 2011 perustettu *International Society of Extracellular*

*Vesicles* (ISEV), eli kansainvälinen solunulkoisten vesikkelien tutkimukseen keskittyvä yhteisö. ISEV:n tavoitteena on luoda ja kehittää edelleen eksosomien ja solunulkoisten vesikkeleiden tutkimiseen yhtenäinen sanasto ja minimivaatimukset tutkimuksille, sekä jakaa aiheesta kirjoitettuja artikkeleita ja uusinta tutkimustietoa. ISEV järjestää myös vuosittain solunulkoisia vesikkeleitä ja eksosomeja tutkiville ryhmille tapaamisen, joissa käydään läpi uusimpia löydöksiä ja linjauksia alan tutkimuksissa. [4]

ISEV:llä on tällä hetkellä jo olemassa minimivaatimukset eksosomi-nimityksen käyttämistä varten tieteellisissä artikkeleissa, ja opinnäytetyön protokollan luomisessa pyritään täyttämään ISEV:n minimivaatimukset karakterisoinnissa [5].

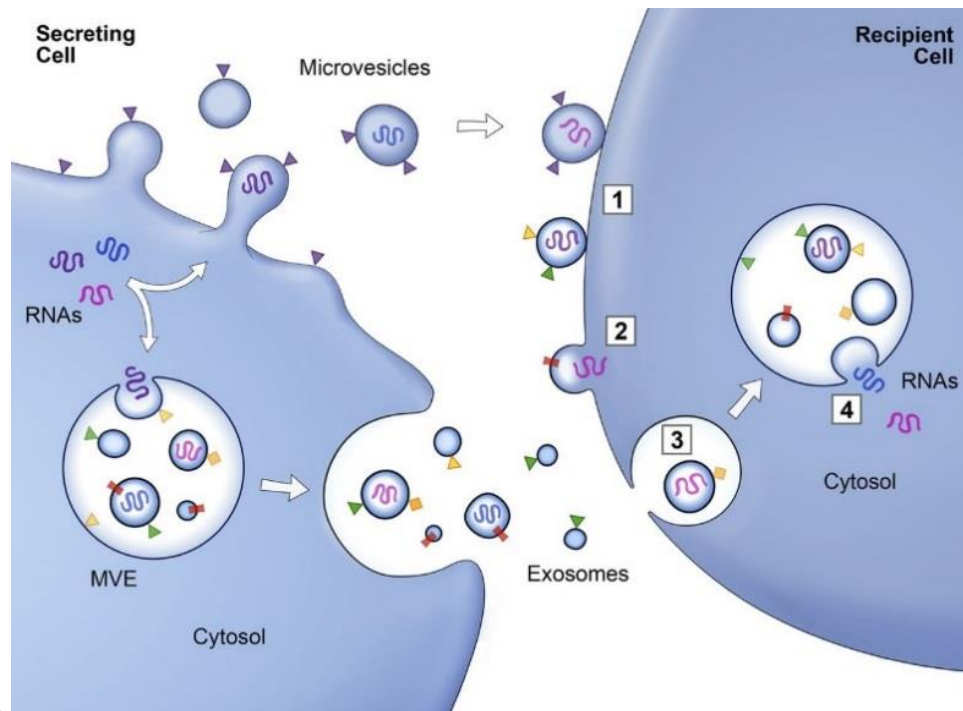
## **2 Solunulkoiset vesikkelit, eksosomit**

Eksosomit löydettiin ensimmäisen kerran vuonna 1983, mutta ne luokiteltiin solusta tuhottavien tai poistettavien turhien molekyylien säiliöiksi. 90-luvun puolenvälin jälkeen hollantilainen Hans Geuzen tutkimusryhmä osoitti *Epstein-Barr*-viruksen muuttamien B-lymfosyyttien erittävän eksosomeja. Näiden eksosomien voitiin todeta kantavan immuunireaktion sopeutumiselle tärkeitä molekyyliä, mistä voitiin päätellä eksosomien voivan olla osa solujenvälistä viestintää. [6; 7.] Nykytiedon perusteella eksosomien tiedetään sisältävän muun muassa soluspesifisiä proteiineja, geneettistä materiaalia (miRNA, mRNA) ja lipidejä [6; 8].

Solunulkoisia vesikkeleitä on useita erilaisia. Riippuen niiden koosta, niiden sisältämästä informaatiosta ja isäntäsolusta, ne nimetään eri tavoin. Eksosomeista puhuttaessa on vielä paljon päällekkäisyyksiä ja yhdenmukainen sanasto puuttuu. [9.]

Eksosomit määritellään 40–100 nm:n kokoisiksi lipidikalvoisiksi useimpien solutyypin erittämiksi membraanivesikkeleiksi, joilla on spesifisiä reseptoreita lipidikalvolla ja jotka kuljettavat isäntäsolulle spesifisiä molekyyliä [9]. Eksosomit muodostuvat solun sisällä multirakkulaisissa endosomeissa, jotka plasmamembraaniin fuusioituessaan vapauttavat eksosomit solun ulkopuolelle. Tämä mahdollistaa niiden kulkeutumisen hyvinkin kauas verenkierron mukana, toimien tiedon välittäjänä (kuva 1). [6.]





Kuva 1. Eksosomien toimiminen solujenvälisessä viestinnässä [7].

Sitä, kuinka eksosomi tunnistaa kohdesolunsa, jos ollenkaan, ei vielä tunneta. Eksosomin pinnalla olevilla proteiinimembraaneilla on väistämättä osansa, mutta tarkka mekanismi on yhä selvittämättä.

## 2.1 Eksosomien toteamisen vähimmäisvaatimukset

Eksosomien ollessa lukuisien tutkimuksien kohteena, sanaston ja vähimmäisvaatimusten ollessa vielä epäselviä, on ISEV määritellyt tieteellisissä tutkimuksissa vähimmäisvaatimukset solunulkoisien vesikkeleiden toteamiselle [5]. Niiden perusteella tulee selvästi ilmoittaa, kuinka eksosomit on eristetty ja esittää proteiiniprofiili eristetystä preparaattista. Lisäksi semikvantitatiivisesti tulisi määrittää neljän eri solun osassa sijaitsevan proteiinin pitoisuus (esimerkiksi vasta-aineleimaamisen kautta):

- 1 transmembraaninen tai lipidisidottu solunulkoinen proteiini
- 2 sytosolinen proteiini
- 3 solunsisäinen proteiini (ei plasmamembraaninen tai endosomaalinen)
- 4 solunulkoinen proteiini (spesifinen tai epäspesifinen sitoutuminen membraaneihin) [5].

Jokaisesta ryhmästä tulisi olla edustettuna ja semikvantitatiivisesti analysoituna yksi proteiini. 1. ja 2. ryhmän proteiinit toimivat positiivisina kontrolleina. Näiden tulisi olla nähtävissä eksosomipreparaatissa tai esiintyä rikastuneena. Ryhmien 3. ja 4. proteiinit toimivat negatiivisina kontrolleina. Niitä ei tulisi näkyä preparaatissa tai ainakin selvästi pienemmässä määrin. [5.]

Eksosomipreparaatista tulisi ottaa myös esimerkiksi elektronimikroskooppikuva (EM) ja määrittää partikkelikoko esimerkiksi *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) -menetelmällä [5].

## 2.2 Eksosomien eristys ja tutkiminen vasta-aineilla

Eristysmenetelmäksi valikoitui suosituista ultrasentrifugaatiosta poiketen saostusmenetelmä. Näin ollen voidaan verrata plasmanäytettä, eristuksen supernatanttia ja eksosomipreparaattia toisiinsa puhtauden ja eristuksen onnistumisen määrittelyssä.

Western Blot (WB) on immunologinen vasta-aineleimauksiin perustuva detektointimenetelmä. Sen avulla voidaan kvalitatiivisesti todeta esimerkiksi proteiinin läsnäolo tai poissaolo [10, s.104–107]. ISEV:n minimivaatimuksissa yhtenä edellytyksenä oli, että WB-analyysissä tulisi myös pyrkiä semikvantitatiiviseen detektointiin, esimerkiksi intensiteetin avulla [5]. Jos detektoinnissa ei ole mahdollisuutta semikvantitatiiviseen analysointiin, WB-analyysi suoritetaan kvalitatiivisena analyysinä

Eksosomien toteamista ja karakterisointia varten valitaan useampi edustava proteiinivasta-aine, joka noudattaa ISEV:n vähimmäisvaatimuksia. Vasta-aineita valittaessa on tärkeää tiedostaa, mikä näytematriisi on (esimerkiksi rotta) ja mikä se olisi tulevaisuudessa (esimerkiksi ihminen). Näin voidaan jo valintavaiheessa pyrkiä

löytämään menetelmän siirrolle näytematriisista toiseen sopivat vasta-aineet, jotka toimivat.

Vasta-aineina voidaan käyttää esimerkiksi anti-flotilliini 1 -, anti- CD9-, anti-seerumi albumiini- ja anti-kalneksiini-vasta-aineita.

### 2.2.1 Flotilliini 1

Anti-flotilliini 1 toimii karakterisoinnissa positiivisena kontrollina solunsisäisten partikkeleiden tunnistamisessa. Näin ollen esimerkiksi abcam® RabMab® Anti-flotilliini 1 (ab133497) -vasta-aine tulee saada näkyviin vasta-aineleimauksessa Western Blotissa (WB) plasmanäytteessä ja eksosomien eristyksessä, mutta ei supernatantista. Tällöin voitaisiin todeta solunulkoisten partikkeleiden rikastuneen tai eristyneen eksosomipreparaattiin.

Abcam® Anti-flotilliini 1 on kanissa tuotettu rekombinantti monoklonaalinen IgG vasta-aine flotilliini 1:lle ja reagoi rotan, ihmisen ja hiiren veressä esiintyvien flotilliini 1 -proteiinien kanssa [11]. Flotilliini kuuluu ISEV:n vähimmäisvaatimuksissa sytosolisiin proteiineihin. Flotilliini 1 on kooltaan noin 47 kDa [5].

### 2.2.2 CD9- proteiini

Anti-CD9 on vasta-aineleimauksessa toinen positiivinen kontrolli, ja sen tulisi näkyä plasma- ja eksosomipreparaatissa, mutta ei supernatantissa. CD9 kuuluu ISEV:n vähimmäisvaatimuksissa transmembraaniisiin tai lipidisidottuihin solunulkoisiin proteiineihin. Näin ollen voitaisiin todeta eristyksessä olevan juuri solunulkoisia partikkeleita.

Abcam® RabMab® Anti-CD9 (ab92726) on myös kanissa tuotettua rekombinantista monoklonaalista IgG-vasta-ainetta CD9 -proteiinille, ja kiinnittyy niin hiiren, rotan kuin ihmisen veressä esiintyvään CD9-proteiiniin. CD9- proteiini on noin 25 kDa:n suuruinen. [12.]

### 2.2.3 Seerumialbumiini

Anti-seerumialbumiini on haastavin proteiinivasta-aine. Se toimii negatiivisena kontrollina, plasman sisältäessä suuria määriä albumiinia. Puhtaassa eristyksessä tämän vasta-aineen avulla voitaisi todeta albumiinin läsnäolo plasma- ja supernatantinäytteissä, mutta puuttuvan eksosomipreparaatista. ISEV:n minivaatimuksissa seerumialbumiini kuuluu solunulkoisiin proteiineihin, jotka herkästi eristyvät rinnakkain eksosomien kanssa. Haastavaa eksosomien puhdistuksessa on albumiinin saaminen kokonaan pois eksosomipreparaatista.

Seerumialbumiinivasta-aine on Santa Cruz Biotechnology Inc ALB (sc-46293), vuohessa valmistettu polyklonaalinen IgG vasta-aine, joka reagoi niin hiiren, rotan kuin ihmisen veressä oleviin albumiiniproteiineihin. Albumiini on noin 66 kDa:n suuruinen. [13.]

### 2.2.4 Kalneksiini

Anti-kalneksiini on eksosomien karakterisoinnissa toinen negatiivinen kontrolli. Se tarttuu kudoksissa esiintyvään kalneksiiniin, jolloin voidaan osoittaa solukudoksen tai sen jäämien läsnäolo. Näin ollen ISEV:n vaatimuksien mukaisesti kalneksiini kuuluu kuitenkin solunsisäisiin proteiineihin, jotka kudosten ja solujen hajotessa vapautuvat. Näiden tulisi näkyä vain kudoksenäytteessä (valmistetaan erikseen), jolloin plasmassa, eksosomeissa eikä supernatantissa tulisi näkyä kalneksiiniä, vain kudoksenäytteessä. Näin voidaan poissulkea muun muassa endoteelisolujen kulkeutuminen verinäytteeseen näytteenottomenetelmästä riippuen.

Kalneksiini (SC-11397) on Santa Cruz Biotechnologies Inc:n valmistama vasta-aine, polyklonaalinen kanissa muodostettu ihmisen, rotan ja hiiren näytteissä olevan kalneksiiniin detektointia varten. Kalneksiini on noin 90 kDa:n kokoinen. [14.]

## 2.3 Eksosomijakauman tutkiminen

Malvern NanoSight NS300 on NTA-analysaattori, jolla voidaan määritellä näytteestä partikkelikokojakauma ja partikkelikonsentraatio (partikkelia/ml). Näin saadaan varmistettua, että eksosomit ovat menestyksekkäästi eristettynä ja näyte ja sen

laimennos ovat edustavia. NanoSightilla täytetään ISEV:n minimivaatimus partikkelikokojakauman määrittelemisestä luotettavasti.

NTA-analyysin ollessa tilastollinen analyysi populaatiosta, tulee ottaa huomioon parametrien vakiointi. Kameran kuvaustaso (camera level) tulisi saada eksosomeja analysoitaessa mahdollisimman ylös, jotta kaikki partikkelit saadaan laskettua ja analysoitua. Tämän lisäksi on tallenteita analysoidessa tärkeää säätää detektion herkkyys (detection threshold) mahdollisimman alas. Kuitenkin niin että eksosominäytteillä se ei menisi alle DT3-tason. Valmistajan suosituksien mukaan eksosomit tulisivat analysoida kameratasoilla 13 -16 ja detektiotasoilla DT3 - DT5 [15]. Koejärjestelyjä tehdessä ja parametreja selvittäessä tämä osoittautui hyvin tärkeäksi asiaksi vakioida. Jotta tulokset ovat vertailukelpoisia, tulisi niiden olla samalla kameratasolla kuvattuja ja detektiotasolla analysoituja. Kiusaus kameratason ja detektiotason muuttamiseen optimaalisemmaksi näytekohtaisesti on suuri. Tätä tulee kuitenkin välttää, jotta vertailukelpoisuus säilytetään.

### 2.3.1 Toimintaperiaate

NanoSightin yksinkertaistettuna periaatteena on valomikroskooppi ja kamera. Valo on lasersäde ja kamera kuvaa videokuvaa näytteestä, joka voi olla joko stabiili tai ruiskupumpun avulla tasaisesti etenevä näyte. Lasersäteen osuessa näytematriisiin (partikkeleita nesteessä), laservalo siroaa partikkelispesifisesti. Mikroskooppi erottaa säteen siroamisen ja intensiteetin ja pystyy näiden avulla laskemaan partikkelin koon. NanoSightin partikkelikokoanalyysi perustuu partikkeleiden Brownin liikkeeseen. Jäljittämällä partikkeleiden Brownian liikettä voidaan laskea Stokes-Einstein yhtälön avulla partikkelin koko. (Kaava 1.) [16.]

$$\frac{\overline{(x,y)^2}}{4} = Dt \Rightarrow Dt = \frac{TK_B}{3\pi\eta d} \quad (1)$$

$K_B$  = Boltzmann Constant  
 $\eta$  = viscosity  
 $T$  = Temperature  
 $d$  = Particle diameter

Partikkelin liike siis korreloi sen kokoa; pienet partikkelit liikkuvat nopeammin ja suuret hitaammin. Menetelmän erityinen etu on sen erotuskyvyssä. Laite seuraa jokaista yksittäistä partikkelia ja luo niille 3D-kuvana intensiteetin mukaisen kaavion. Tämän avulla laite kykenee erottamaan samankokoiset, mutta eri intensiteetillä valoa siroavat partikkelit erillisiksi partikkeleiksi. [16.]

### 2.3.2 Mittausolosuhteiden optimointi

NanoSightilla voidaan mitata 10–2000 nm:n kokoisia partikkeleita. Mittauksen rajoituksiin vaikuttaa näytematriisi. Voimakkaasti valoa siroavat partikkelit voidaan luotettavasti detektoida ja laskea 10 nm:n kokoon saakka. Biologiset näytteet (kuten eksosomit) siroavat valoa huonommin ja näiden kohdalla voidaan pitää alarajana 40 nm:n kokoisia partikkeleita. Sen alapuolelle tulevat havainnot ovat taustan kohinaa tai muuta epäspesifistä erottumista. [16.]

Laiterajoituksina partikkelikonsentraatiossa on minimi  $10^6$  partikkelia/ml pitoisuudet ja maksimina  $10^9$  pitoisuudet. Minimirajalla vaaditaan pitkä videokuvaus näytteestä, jolloin vertailukelpoisuus huononee. Ylärajalla erotuskyky huononee selvästi, kun partikkeleita on liikaa. [16.]

NanoSightin live videokuva auttaa ymmärtämään saatuja tuloksia, kun voidaan nähdä mitä laskujen perusteena olevalla videolla tapahtuu ja siten voidaan tulkita tuloksia oikein [16]. Toistettavuus NanoSightilla oikeiden parametrien löydyttyä on 2-3 %:n luokkaa. Kyseessä onkin tilastollinen analyysi, jolla analysoidaan partikkelipopulaatiota (useimmiten) liikkuvassa matriisissa. [17.]

Eksosomieristysten aikana tehdyn 220 nm:n ruiskusuodatuksen ansiosta NanoSight -analyysissä voi luottaa, ettei partikkeleiden päällekkäisyyttä oikeilla asetuksilla tule. Ainoastaan liuottimen epäpuhtaudet (esimerkiksi PBS) tai linjastossa olevat ilmakuplat voivat aiheuttaa pienien partikkelien peittymistä alleen. [17.]

NanoSight analyysissä pääpaino on näytteiden oikean laimennoksen ja kameran asetusten optimoinnissa. Taustan korjaus esimerkiksi PBS pohjaiselle näytteelle kun PBS sisältää partikkeleita toivottua enemmän, on hyvin olennaista oikeiden tulosten saamiseksi. Lineaarisilla mittauspareilla (1:1 ja 1:2 laimennos) voidaan todeta lineaarisuuden säilyminen näytteiden välillä, mikä lisää tulosten luotettavuutta. [15.]

### 3 Menetelmät ja työn suoritus

Eksosomien karakterisoimiseksi jouduttiin käyttämään useita menetelmiä, jotta ISEV minimivaatimukset täyttyisivät [5]. Eksosomit eristettiin saostamalla rotan veren plasmasta, proteiiniprofiili eri näytteille selvitettiin SDS-PAGE-geelelektroforeesilla. Proteiinien tunnistamiseksi suoritettiin Western Blot -vasta-aineleimaus, jossa proteiinit siirrettiin geeliltä membraanikalvolle sähkövirran avulla. Eksosomien proteiinikonsentraatio määritettiin rinnakkain sekä Qubit® 2.0 fluorometrillä että Pierce™ proteiinikonsentraatiomittauksella (spektrofotometrinen menetelmä). Lisäksi eksosomien kokojakauma ja partikkelikonsentraatio määritettiin NTA-menetelmällä. Näytteistä tehtiin myös EM-kuvantaminen tutkijatohtori Jenni Karttusen toimesta.

#### 3.1 Näytteiden valinta

Ennen karakterisoinnin varsinaista aloittamista suoritettiin useampien analyysien optimointia testinäytteillä. Näytteet olivat lopetusplasmanäytteitä dekapitaation jälkeen kerättynä. Näillä saadaan optimoitua erilaisia parametreja ja selvitettyä vaadittavat laimennokset ja näytemäärät, joita kukin karakterisoinnin osa-alue vaatii. Näin voidaan minimoida jatkossa näytemäärät ja ennakoida tarvittavat laimennokset. Menetelmäkohtaiset optimoinnit käsitellään myöhemmin. Opinnäytetyössä käytetyt näytteet olivat:

- Rotta 3: cortex **3.1** (leikkeestä proteiinieristys)
- Rotta 3: hippocampous **3.3** (leikkeestä proteiinieristys)
- Rotta TPi **3.2** (**A** = eksosomi, **B** = supernatantti, **C** = plasma)
- Rotta 3 **Q** (**QP** = plasma, **QE** = eksosomi, **QS** = supernatantti)

Varsinaisen protokollan luomista varten käytettiin naiivin rotan lopetusplasmaa (Rotta 3). Samasta plasmanäytteestä ja eristyksestä tehtiin EM-kuvannus, Pierce™ -proteiinipitoisuusanalyysi, SDS-PAGE- ja WB-analyysit neljällä eri vasta-aineella. Saman rotan aivojen Cortex-viipaleesta valmistettiin tarvittava kudoksenäyte kalneksiini-vasta-aineen positiivista kontrollia varten.

Qubit® fluorometriä käytettiin 3.1 ja 3.3 proteiinieristysten konsentraation määrittämisessä. Pierce™-proteiinipitoisuusanalyysillä mitattiin 3.2- ja Q-näytteiden pitoisuudet valmistajan ohjeiden mukaan. Liitteessä 1 esitetään Pierce™-työohje protokollan ohessa. Näytteet mitattiin spektrofotometrisesti 595 nm aallonpituudella. Qubit® fluorometrinen menetelmä suunniteltiin alun perin ensisijaiseksi menetelmäksi, mutta päätettiin Pierce™-analyysin käyttämiseen paremman luotettavuuden vuoksi.

### 3.2 Eksosomien eristys ja SDS-PAGE-analyysi; Proteiiniprofiilin määrittäminen.

Eksosomien eristys tehtiin kaupallisella eristyskitillä, Exiqon MiRCURY™ Exosome Isolation Kit. Liitteessä 1 on esiteltynä valmistajan työohje protokollan ohessa. Näytemäärän muuttuessa ohjeesta poikkeavaksi suhteutettiin saostus ja liuotuspuskureiden määrät samassa suhteessa [18, s 10]. Toistuvana poikkeuksena jokainen näyte (supernatantti) suodatettiin heti ensimmäisen sentrifugoinnin jälkeen Millipore Millex® 22µm-ruiskusuodattimella ennen kuin eristystä jatkettiin ohjeen mukaan.

SDS-PAGE:n optimoinnissa käytettiin taulukossa 1 esitettyjä ajoaikoja ja akryyliamidipitoisuuksia.

Taulukko 1. SDS-PAGE- ajon optimointi

| Koe | SDS-PAGE       |        |     |
|-----|----------------|--------|-----|
|     | Erotusgeelin % | ajoka  | V   |
| 1   | 15%            | 75min  | 200 |
| 2   | 15%            | 110min | 200 |
| 2   | 12%            | 120min | 200 |
| 4   | 12%            | 80min  | 200 |
| 5   | 12%            | 80min  | 200 |
| 6   | 12%            | 80min  | 200 |
| 7   | 12%            | 80min  | 200 |
| 8   | 12%            | 80min  | 200 |
| 9   | 12%            | 80min  | 200 |



### 3.3 Western Blot -analyysi ja sen optimointi; Spesifisten proteiinien detektointi detektointi.

Käytössä oli semi-dry proteiinien siirto, jonka etuna on tehokkaampi ja nopeampi proteiinien siirto membraanille, verrattuna märkäsiirtoon [19]. Proteiinien siirrossa oli käytössä Hoefer TE77XP Semi-Dry Blotter ja membraanina Amersham Hybond P 0.45 PVDF 0.45  $\mu\text{m}$  [20].

Aiemmin ilmenneiden siirto-ongelmien vuoksi alkuun oli käytössä kaksi rinnakkaista puskurimenetelmää, joilla proteiinien siirto toteutettiin. Ensimmäinen menetelmä oli ns. kolmen puskurin menetelmä, joka on Jyväskylän yliopiston opintomateriaalien pohjalta tehty ja muokattu. Toinen puskurimenetelmä on yhden puskurin menetelmä. Se löydettiin siirtolaitteen valmistajan laitemanuaalista (Towbin puskuri) ja tavoitteena oli selvittää, olisiko sillä edullinen vaikutus proteiinien siirtoon näytematriisillamme. [20.]

Western Blot:n optimoinnissa keskityttiin virran voimakkuuden muuttamiseen ja puskurimenetelmien vertaamiseen (taulukko 2). Liitteessä 1 on esitetty työohje kokonaisuudessaan protokollan ohessa.

Taulukko 2. Western Blot-menetelmän optimointi

| Western Blot |            |    |         |        |                     |                        |                          |                       |
|--------------|------------|----|---------|--------|---------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Koe          | Siirtoaika | mA | 3buffer | towbin | Geelien lkm ja koko | 1° vastaine inkubointi | 2° vasta-aine inkubointi | detektointi           |
| 1            | 1h         | 45 |         | x      | 1kpl<br>7,5 x 8 cm  | +4 o/n                 | 1h RT                    | Storm 635nm           |
| 2            | 1h         | 45 | x       | x      | 2kpl<br>7,5 x 8 cm  | +4 o/n                 | 1h RT                    | Gbox                  |
| 3            | 1h         | 45 | x       | x      | 2kpl<br>7,5 x 8 cm  | +4 o/n                 | 1h RT                    | Gbox                  |
| 4            | 1h         | 45 | x       | x      | 1kpl<br>7,5 x 8 cm  | -                      | -                        | ponceau/<br>coomassie |
| 5            | 1h         | 75 | x       | -      | 1kpl<br>7,5 x 8 cm  | -                      | -                        | ponceau/<br>coomassie |
| 6            | 1h         | 75 | x       | -      | 1kpl<br>3,5 x 8 cm  | +4 o/n                 | 2h RT                    | Gbox                  |
| 7            | 1h         | 75 | x       | -      | 2kpl<br>3,5 x 8 cm  | 2h RT                  | 2hRT                     | Gbox                  |
| 8            | 1h         | 75 | x       | -      | 2kpl<br>3,5 x 8 cm  | +4 o/n                 | 1h RT                    | Gbox                  |
| 9            | 1h         | 75 | x       | -      | 1kpl<br>7,5 x 8 cm  | 1h RT                  | 1h Rt                    | gbox                  |

Vasta-aineista käytettiin taulukossa 3 esitettyjä laimennoksia.

Taulukko 3. Detektoitujen vasta-aineiden käyttöläimennokset

| Vasta-aine            | Laimennos | Valmistajan suositus                        |
|-----------------------|-----------|---|
| Anti-Seerumialbumiini | 1:500     | 1:100 - 1:1000                              |
| Anti-Kalneksiini      | 1:500     | 1:100 - 1:1000                              |
| Anti-CD9              | 1:6000    | 1:2000,<br>unpurified use 1:1000 - 1:10 000 |
| Anti-Flotilliini 1    | 1:10 000  | 1:10 000 - 1:50 000                         |

Sekundäärisenä vasta-aineena kaikilla muilla paitsi albumiinilla oli Invitrogen™ Peroxidase-Goat Anti-Rabbit IgG (65-6120, käytetty laimennos 1:3000). Albumiinin vasta-aineena käytettiin Santa Cruz Rabbit Anti-Goat IgG-HRP (sc-2922, käytetty laimennos 1:3000). Sekundääriset vasta-aineet perustuvat molemmat piparjuuriperoksidaasin ja substraattien aiheuttamaan kemilumenesenssiin.

Kaikki vasta-aineet laimennettiin 1x TEN + 0,1% TWEEN 20-liuokseen ja substraattina käytettiin Thermo Fischer Scientific SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (34080). Detektorina käytettiin Syngene GBox Chemi XT4 -laitetta, jolla saatiin kuvannettua membraanit ja kemilumenesenssisignaali detektoitua.

#### 3.4 Nano Sight (NTA) - analyysi; Partikkelikokojakauman ja konsentraation määrittäminen.

Mittausolosuhteiden optimointia varten valmistettiin useampi laimennussarja ja niitä analysoitiin yhden kameratason tai yhden detektiotason erolla (taulukko 4). Valmistajan suositusten mukaan 20 %:n pitoisuuseroja pienempiä eroja ei luotettavasti voida analysoida [15].

Taulukko 4. Laimennossarjat NanoSight-optimointia varten, poikkeusnäytteet 4.2 ja 4.1 vastaavat 3.2 näytettyä

|                          | Dilution series | Näyte       | PBS ul | Laimennos |
|--------------------------|-----------------|-------------|--------|-----------|
| Test samples,<br>4.2+4.1 | A               | 5 ul alkup. | 2000   | 1:400     |
|                          | B               | 100 ul A    | 1900   | 1:20      |
|                          | C               | 100 ul B    | 1900   | 1:20      |
|                          | D               | 200 ul C    | 1800   | 1:10      |
|                          | E               | 200 ul D    | 1800   | 1:10      |
|                          | F               | 200 ul E    | 1800   | 1:10      |
|                          | G               | 200 ul F    | 1800   | 1:10      |
|                          | H               | 200 ul B    | 800    | 1:5       |
| Q+P 2                    | A               | 5 ul alkup. | 2000   | 1:400     |
|                          | B               | 200 ul A    | 1800   | 1:10      |
|                          | B1              | 200 ul A    | 800    | 1:5       |
|                          | C               | 200 ul B    | 1800   | 1:10      |
|                          | C1              | 800 ul C    | 200    | 4:5       |
|                          | D               | 400 ul C    | 1600   | 1:5       |
|                          | E               | 500 ul D    | 500    | 1:2       |

## 4 Tulokset

Tuloksien vaihtelevuuden vuoksi opinnäytetyössä esitellään vain ne tulokset, jotka sopivat hyvin tähän kokonaisuuteen ja joiden perusteella voidaan protokolla karakterisoinnille tehdä.

### 4.1 Proteiinipitoisuuden määrittäminen

Q- sarjan näytteet ovat varsinaisia optimointinäytteitä ja A-, B- ja C-näytteet ovat harjoitusnäytteitä. QE/A ovat eksosominäytteitä, QS/B ovat supernatanttinäytteitä, ja QP/C ovat plasmanäytteitä.

Tulokset taulukoitiin ja laskettiin standardisuoran perusteella kullekin näytteelle proteiinipitoisuus, jonka perusteella vakioitiin SDS-PAG- näytteiden konsentraatiot (Taulukko 5 ).

Taulukko 5. Pierce™-proteiinipitoisuudet 3Q- ja 3.2-näytteille

|               | Näyte | ABS <sub>595</sub> | ug/ul |
|---------------|-------|--------------------|-------|
| Rotta 3Q      | QE    | 0,966              | 11,71 |
|               | QS    | 1,155              | 14,38 |
|               | QP    | 2,37               | 31,56 |
| Rotta TPI 3.2 | A     | 1,242              | 18,2  |
|               | B     | 1,636              | 24,8  |
|               | C     | 2,161              | 33,5  |

Harjoitusnäytteinä käytettävät näytteet mitattiin Qubit®-fluorometrillä laitteen kitin ohjeiden mukaan (taulukko 6).

Taulukko 6. Proteiinipitoisuudet näytteille 3.1 ja 3.3 Qubit®-fluorometrillä

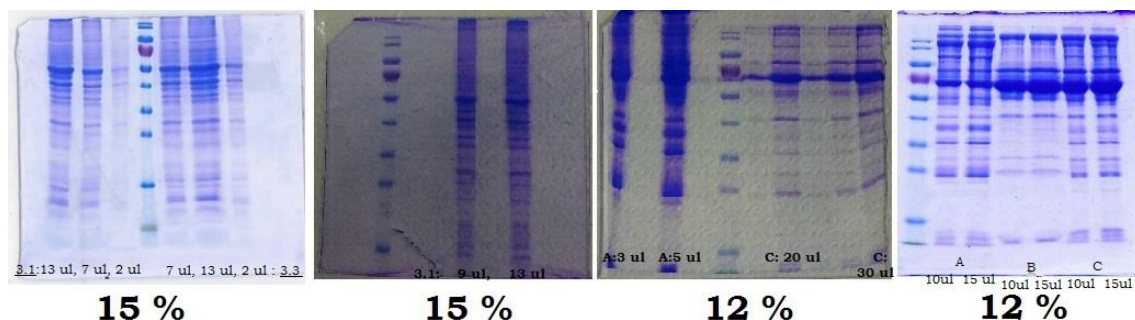
| 3.1 and 3.3 näytteiden proteiinipitoisuusanalyysit |           |                        | Todellinen pitoisuus<br>(laim. huom.) |
|--|-----------|------------------------|---------------------------------------|
| Näyte  | Laimennos | Mittaustulos,<br>ug/ml |                                       |
| 3.1 a  | 1:200     | 15,8                   | 3160                                  |
| 3.1 B  | 1:200     | 14,6                   | 2920                                  |
| 3.1 KA   |           | 15,2                   | 3040                                  |
| 3.3  | 3:200     | 22,3                   | 1487                                  |

#### 4.2 SDS-PAGE -analyysin optimointi

SDS-PAGE:n tavoitteena oli erottaa selvästi eksosomien proteiiniprofiili verrattuna plasmaan ja supernatanttiin, minkä avulla voitaisiin osoittaa eksosomien onnistunut eristys. Tavoitteena oli saada hyvin eristynyt opinnäytetyössä optimoitu tulos. Kuvassa 2 nähdään lähtötilanne proteiiniprofiilin määrittämisessä, ja mihin on päädytty. Suurimmat vaikutukset erottumisessa saatiin aikaan siirryttäessä 15- %:sesta geelistä 12- %:seen geeliin ja valmistamalla SDS-PAGE-näytteet pitoisuudeltaan ja pipetoinneiltaan järkeviksi. Näytteiden proteiinipitoisuuksien ollessa suuria, olisi pipetoinneissa menty 1–3 µl:an pipetointimääriin, jolloin virhemarginaali kasvaa ja rinnakkaisien määrityksien vertailukelpoisuus kärsii. Proteiinipitoisuuksien määrittämisen jälkeen saatiin kaikki kolme näytettä (eksosomi, supernatantti ja plasma) laimennettua saman konsentraation tasolle ja pipetoinnit 10–15 µl:n alueelle, jolloin hajonta pienenee

ja on helpompaa vertailla näytteitä, joissa proteiinimäärä jokaisessa kaivossa on likipitään sama.

SDS-PAGE-geelien kuvavertailussa (kuva 2) voidaan nähdä erottumisessa selvä ero. Vaikka 12 %:ssa geeleissä näyttemäärät ovat vielä melko suuria (jopa 30  $\mu$ l) niin bändit geelissä erottuvat selkeämmin. 15 %:ssa geeleissä erottuminen ei ole läheskään yhtä selkeää.



Kuva 2. SDS-PAGE geelien vertailu. Coomassie Brilliant Blue (CBB) -värjäys.

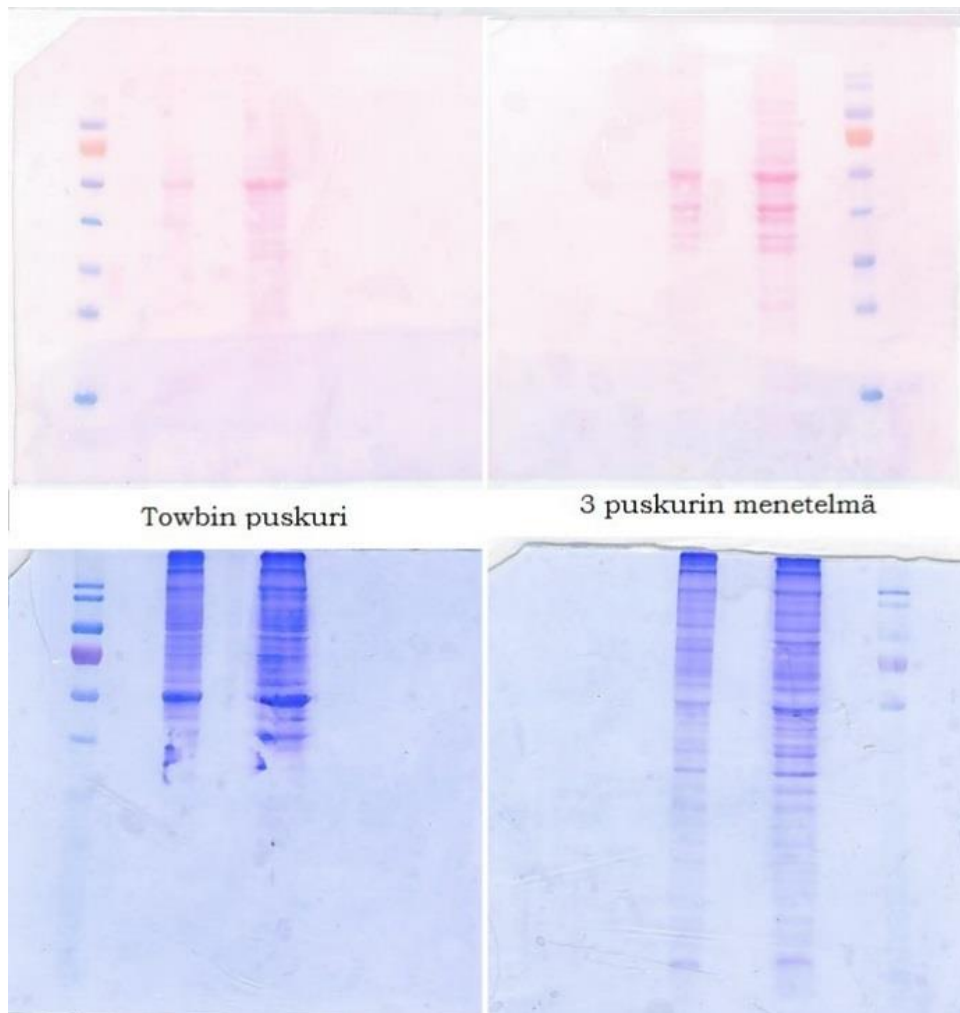
Myös SDS-PAGE-geeleissä oli selvästi nähtävissä joidenkin bändien rikastuminen plasmasta eksosomeihin. Proteiiniprofiili olisi ollut kuitenkin parempi, jos olisi voitu selvästi osoittaa joidenkin bändien puuttuvan eksosomin profiilista ja löytyvän supernatantin puolelta. Tämä viestii siitä, että eksosomien eristäminen ja puhtaus eivät ole aivan toivotulla tasolla, vaikka rikastumista selvästi tapahtuu. Positiivista kontrollia ei ollut saatavilla.

#### 4.3 Western blot -analyysi

##### 4.3.1 Menetelmän optimointi

Western Blotissa siirtoaikoja, puskurimenetelmää ja myös siirron milliampeerimääriä muuttamalla saatiin optimoitua siirto proteiineille sopivaksi (kohdassa 3.4; taulukko 3). Western Blot -optimoinnissa kokeiltiin kahta eri puskurimenetelmää. Muutamien kokeilujen jälkeen siirtolaitteen valmistajan ohjeiden mukainen Towbin puskuri jätettiin pois käytöstä sen aiheuttaman hyvin epätasaisen proteiinien siirron vuoksi (kuva 3). Siirrossa käytetty virta 45 mA vastasi valmistajan suosituksia, ja yhdellä 7,5 x 8,0 cm geelillä 75 mA ylitti suositukset. Kuitenkaan ei huomattu muutoksia geelimäärän tai koon

muuttuessa, ja kaksoismembraanilla kokeillen eivät proteiinit tulleet ensimmäisestä membraanista läpi, vaan jäivät siihen. Vasta-aineleimautumisien optimointia ei varsinaisesti ehditty aloittaa.

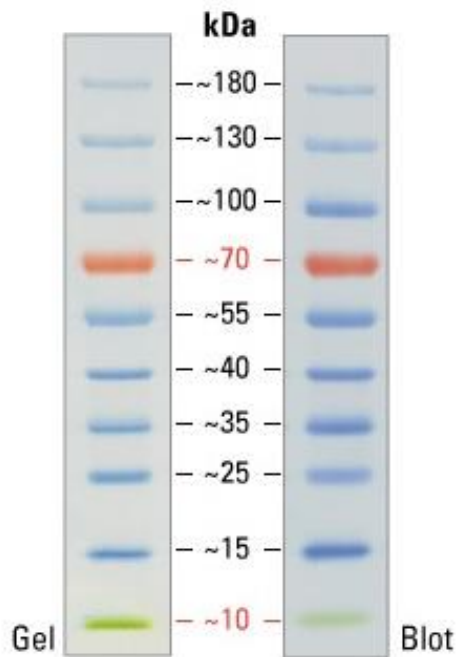


Kuva 3. Vasemmalla 1 puskurin menetelmän membraani värjättyinä Ponceaulla ja geeli värjättyinä Coomassie Blue:lla. Oikealla puolella vastaavat kuvat 3 puskurin menetelmästä. Huomaa pienien proteiinien siirtyminen vs suurien proteiinien siirtyminen.

Useista kokeiluista päädyttiin vakioimaan WB-ajoparametreiksi siirtoon 1 h 7 mA, käyttämään 3 puskurin menetelmää, geelien koolla tai määrällä ei suuria eroja nähty. Vasta-aineista primäärinen vasta-aine inkuboitui 1 h RT tai +4 °C ja sekundääriselle vasta-aineelle inkubointi suoritettiin 1 h RT.

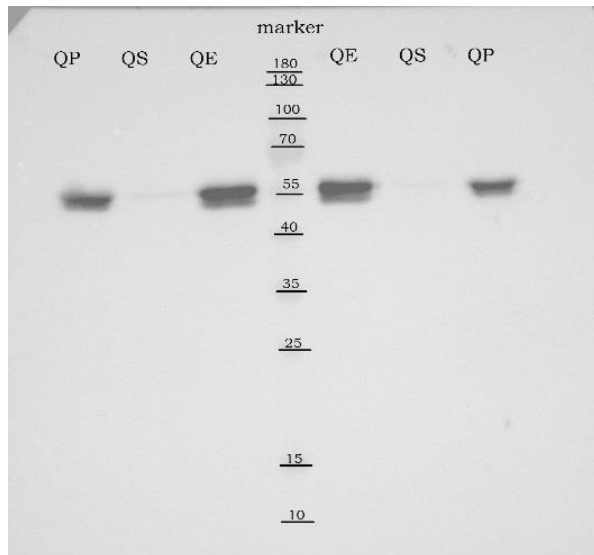
#### 4.3.2 Spesifiset vasta-aineleimaukset

Käytettiin esivärjättyä markkeria Thermo Fischer Page Ruler™ 10-180 kDa (kuva 4), sillä kuvantamislaitteella saatiin kuvattua myös membraani ja kuvankäsittelyllä siirrettyä markkeri ja kemilumenesenssibändit samaan kuvaan. Kemilumenesenssi markkerin ongelmaksi muodostui sen puhkipalaminen näytteiden bändien vaatiessa pidempiä valotusaikoja.



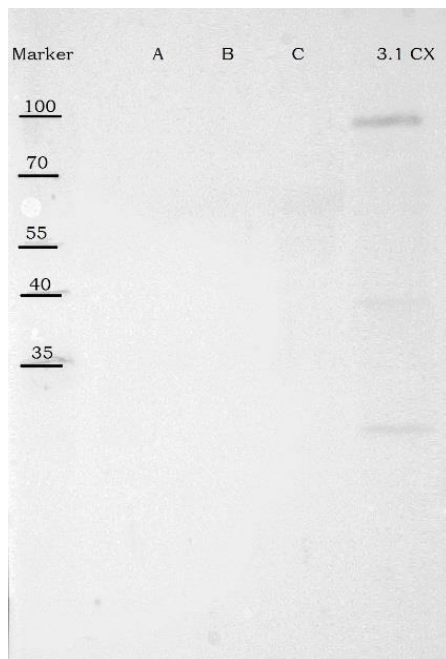
Kuva 4. Thermo Fischer Page Ruler™ 10-180 kDa

Kuvassa 5 flotilliini-proteiini näkyy markkerin 55 kDa bändin alapuolella, mikä viittaa oikean kokoluokan proteiiniin (48 kDa). Flotilliini näkyy voimakkaasti eksosominäytteessä (QE), hieman heikommin plasmassa (QP) ja hyvin heikosti supernatantissa (QS). Flotilliinia ei pitäisi olla supernatantissa, mikä tarkoittaisi sitä, että kaikki eksosomit olisi saatu eristettyä.



Kuva 5. Flotilliini-vasta-ainedetektion tulokset

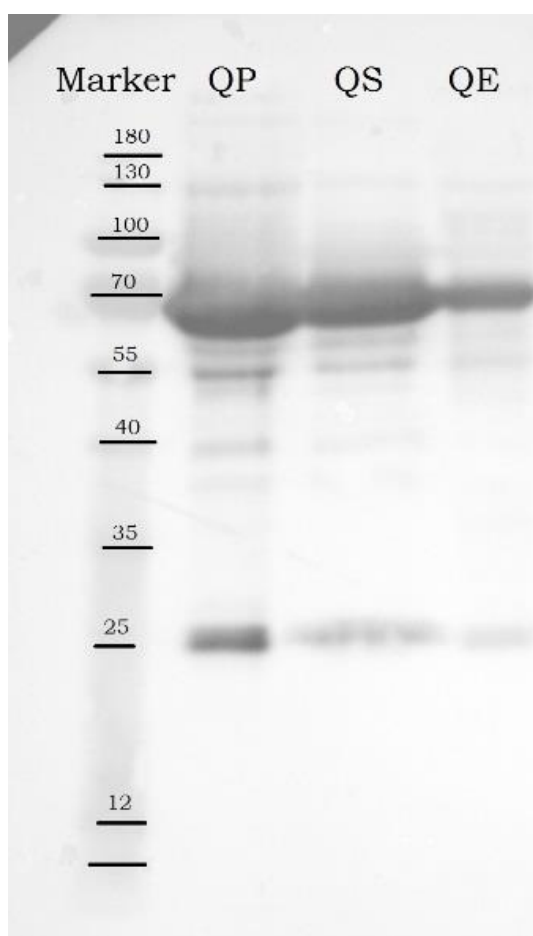
Kalneksiinin vasta-aineväryksestä saatiin odotettu tulos (kuva 6). Tarkoituksenmukaista olisi, että kalneksiini-proteiini voitaisi todeta vain ja ainoastaan kudoksenäytteestä, jolloin plasman eristämisessä on onnistuttu välttämään kudostaminoatit. Menetelmä vaatii siis positiiviseksi kontrolliksi kudoksenäytteen (tässä cortex-näytteestä eristetty proteiininäyte, 36.1 CX). Kuvan 6 mukaan eristetyt näytteet A (eksosomit), B (supernatantti) ja C (plasma) eivät sisältäneet kudostaminoatioita.



Kuva 6. Kalneksiini- vasta-ainedetektion tulokset. Näytteet A (eksosomit), B (supernatantti) ja C (plasma).



Albumiinin tulokset ovat haastavia. Optimitilanteessa WB-kuvissa nähtäisiin voimakas albumiinibändi QP ja QS näytteissä, eikä lainkaan QE-näytteessä. Analysoiduissa näytteissä albumiinia ei ole saatu läheskään kokonaan eristettyä pois eksosomipreparaatista. Supernatantissa sitä pitäisi olla runsaammin kuin eksosomipreparaatissa, jotta eristyksen voisi sanoa olevan parempaa. Osa albumiinista saadaan kuitenkin poistettua eristyksen aikana, kuten kuvassa 7 nähdään. Albumiinin bändi näkyy markkerin 70 kDa merkkiviivan kohdalla tai hieman alla (albumiini 66 kDa). Ristikontaminaation (albumiini ja CD9 samassa näytteessä tahattomasti) vuoksi nähdään epäspesifistä leimautumista, mutta myös CD9 leimautuneena



Kuva 7. Albumiini- ja CD 9 -proteiinien vasta-ainedetektion tulokset

CD9- leimautumisessa oli haasteena ristikontaminaatio (albumiini ja CD9 samassa näytteessä tahattomasti). Menetelmä tulisikin selvästi optimoida. CD9-proteiinin tuloksissa näkyy vahva bändi QP-näytteessä, erikoisesti leviävä heikko bändi QS-näytteessä ja heikko bändi QE-näytteen kohdalla (kuva 7). CD9-proteiinin bändi tulisi olla voimakas eksosominäytteessä (QE), näkyvä plasmanäytteessä (QP) ja

supernatanttinäytteessä (QS) sitä ei haluttaisi nähdä lainkaan. Näin ollen voidaan todeta eristyksen olevan epätäydellistä.

#### 4.4 NTA-analyysi

Nanosightin tulokset jäivät hieman hämmäntäviksi, ja niiden perusteella voidaan tehdä alustava protokolla NTA-analysointia varten, Laimennossarjat olivat melko pieniä (taulukko 4), mutta tarvittaessa saatiin suurempia eroja tehtyä vielä paikan päällä uusin laimennoksia. Tulosten käsittelyyn on otettu vain muutamia onnistuneita rinnakkaisia määrytyksiä, joiden perusteella voidaan tehdä oletuksia protokollaa varten.

NTA-tuloksissa on tietoisesti jätetty keskihajonta (yhdestä näytteestä 3–5 kpl 60 s:n mittaisia videoita/analyysijä) käsittelystä pois. Tässä vaiheessa karkeat linjat riittävät ja tuloksien muuttujien runsauden vuoksi niitä on mahdotonta kovin tarkasti analysoida. Karkeammalla tasolla tulosten käsittely säilyy riittävän yksinkertaisena, jolloin voidaan luoda pohja protokollalle. Jatkossa asiaan täytyy kiinnittää enemmän huomiota.

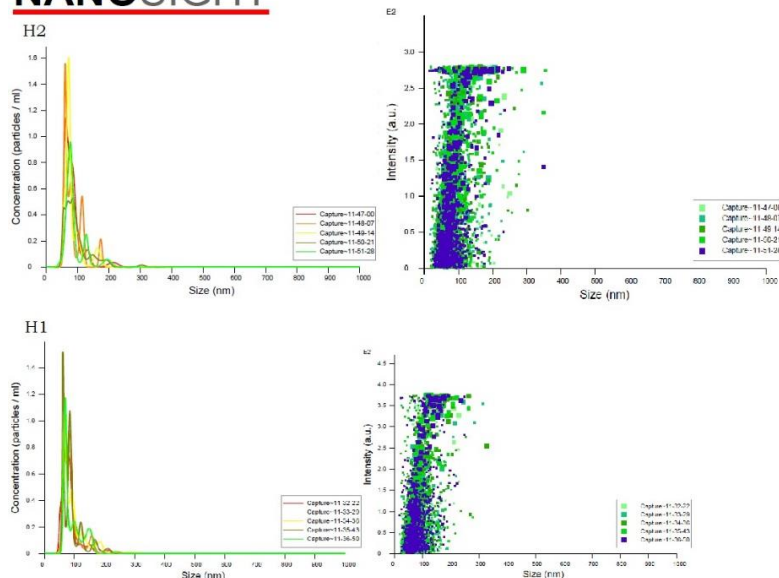
Tehtyjen laimennussarjojen mittauksista mukaan otetut tulokset löytyvät taulukosta 7. Taulukkoon on kerätty mitattujen näytteiden kunkin ajon keskiarvo konsentraatiosta, kameran taso (CL) ja detektiotaso (DT). Lisäksi muutamista on esimerkin luontoisesti tulostuskäyrä ja pistekaavio analyysistä. (Kuva 8.)

Taulukko 7. Optimointiajojen tuloksia; poikkeusnäytteet 4.2 ja 4.1 vastaavat Rotta TPi 3.2 -näytettä

|                           | Näyte | conc               | CL | DT |
|---------------------------|-------|--------------------|----|----|
| Testinäytteet,<br>4.2+4.1 | B1    | $6,6 \times 10^8$  | 13 | 4  |
|                           | B2    | $1,23 \times 10^9$ | 14 | 4  |
|                           | B3    | $7,45 \times 10^8$ | 12 | 4  |
|                           | H1    | $3,4 \times 10^8$  | 13 | 3  |
|                           | H2    | $3,71 \times 10^8$ | 14 | 3  |
| Rotta 3Q                  | D2    | $2,78 \times 10^7$ | 15 | 4  |
|                           | C1.1  | $7,08 \times 10^7$ | 14 | 3  |
|                           | C1.3  | $5,75 \times 10^7$ | 15 | 3  |
|                           | B1    | $1,21 \times 10^8$ | 15 | 3  |
|                           | B1.1  | $4,72 \times 10^8$ | 15 | 3  |
|                           | B1.2  | $2,97 \times 10^8$ | 14 | 3  |

Näissä on kaikki saman näytteen mittaukset päällekkäin, jotta voidaan nähdä liikkuvan näytefaasin haasteet ja toisaalta laitteen suorituskyvyn taso. Optimitalanteessa partikkelien kokoa esittävän grammin piikkien resoluutio (erottuminen) olisi 1.5.

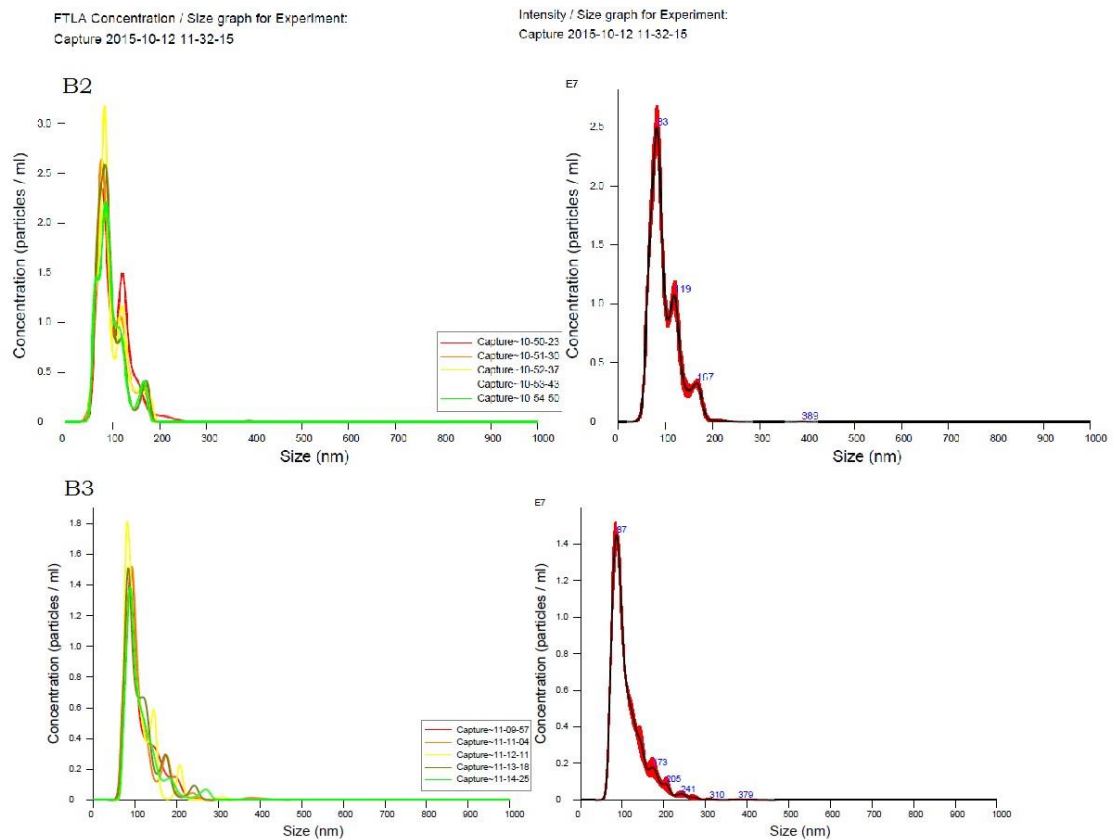
## NANOSIGHT



Kuva 8. H2- ja H1-näytteet. Vasemmalla kerrostettu partikkelikokojen käyrät ja oikealla niitä vastaavat pistekaavio. H1-näytteessä varsinkin näyttäisi erottuvan toinen samaa kokoluokkaa, mutta eri intensiteetillä oleva partikkeli. H2-näytteellä nähdään sama ilmiö, mutta ei aivan niin selvästi.

Lisäkehitystyön lisäksi NanoSightille lähtötason protokollaa varten opinnäytetyön tulosten pohjalta suositellaan CL14 DT4-tasoja, ja näytelaimennokseksi 1:4000, joka vastaa laimennossarjojen tuloksissa 3Q-sarjasta B-laimennosta. Konsentraatio sijoittuu optimaaliselle tasolle, kameran taso on toiseksi ylimmässä (15) ja detektiotaso on alhaisin mahdollinen eksosomeille (3). Näillä asetuksilla voisi hyvin lähteä vakioimaan protokollaa eteenpäin. Tarvittaessa paikanpäällä voi tehdä lisälaimennoksia. Näytteen suspension homogeenisuuteen olisi syytä kiinnittää huomiota ja selvittää mahdollista eksosomien aggregoitumista ja sen aiheuttamia haasteita analyysissä. Myös videoiden tallentaminen analyysitulosten ohien osoittautui tärkeäksi, jotta voi jälkeenpäin tarkastella esimerkiksi syitä konsentraation muutokseen tai tutkia muita ongelmia.

Kuvassa 9 nähdään kahden onnistuneen näytteen esimerkkikäyrät. Molemmissa näkyy selvää yksittäistä vaihtelua käyrien välillä, mutta keskiarvokäyrät painottuvat molemmissa melko kauniisti muodostaen selvät painotukset.



Kuva 9. B2- ja B3-näytteiden koontikäyrät (vas) ja keskiarvopainoitettu käyrä (oik).

B2-näytteessä on partikkelipopulaatiot kokoa 83, 119 ja 167, B3-näytteessä populaatio painottuu 97 partikkelikokoon. Tilastollisessa populaation partikkelikoon määrittämisessä ja etenevässä näytenäytteenä tulee väistämättä vastaan keskiarvon painottaminen. Myös homogeenisen suspension säilymisen vaikutus korostuu.

## 5 Päätelmät

Opinnäytetyön tavoitteena oli luoda protokolla eksosomien karakterisoimiseksi ISEV:n minimivaatimusten mukaisesti. Opinnäytetyössä protokolla saatiin optimoitua, mutta se vaatii vielä työstämistä eikä sellaisenaan ole täysin valmis.

SDS-PAGElla saatiin selkeät proteiiniprofiilit tehtyä eksosomeille, supernatantille ja plasmalle. Proteiini määrää per kaivo voisi vielä vähentää, jotta erottuminen olisi

parempaa. Todettiin, että alle 15  $\mu\text{l}$  ja noin 12  $\mu\text{g}$ /kaivo näytemäärällä saadaan jo voimakkaita bändejä. Jopa 10  $\mu\text{g}$ /kaivo näytemäärä voisi riittää. Työn kehittämistä tulisi jatkaa miettimällä, onko tässä vaiheessa jatkotutkimusten kannalta tarvetta saada eksosomien eristystä puhtaammaksi. Tämän voisi tehdä esimerkiksi yhdistämällä ultrasentrifugaatiota ja saostusmenetelmää. Western Blot-vasta-aineleimaukset tulevat vaatimaan vielä työtä. Membraaneilla tapahtui myös voimakasta epäspesifistä leimautumista, sekundäärinen vasta-aine mm. leimasi toistuvasti markkerin bändien välit. Lähtökohtaisesti vasta-aineet toimivat, mutta menetelmä pitänee optimoida vielä. Optimitalanteessa SDS-PAGE- ja WB- analyysit veisivät korkeintaan kaksi työpäivää.

Nanosight-analyysi vaatii eniten jatkotyöstöä protokollan vahvistamiseksi tai muuttamiseksi. Jatkossa olisi hyvä selvittää fluoresoivien leimojen käyttämistä ja filttareiden hankkimista laitteelle. Näin näytematriisin kanssa ei tulisi niin suuria haasteita, kun fluoresoivalla leimasimella voitaisi detektoida vain leimautuneita partikkeleita, mutta myös kokonaispartikkelimäärää.

Protokollan läpivienti vaatii tarkkuutta ja suunnitelmallisuutta, mutta hyviä tuloksia saadaan suhteellisen pienellä työmäärällä. Protokolla saatiin luotua minimaaliselle näytemäärälle (eksosomieristyksen pitoisuus korkea), mikä mahdollisesti johtuu siitä, että puhdistus ei ole täydellistä. Jos preparaatin puhtautta saadaan selvästi parannettua jollakin menetelmällä menettämällä konsentraatiota voimakkaasti, tulee se huomioida protokollassa. Tällöin näytemäärät kasvavat jonkin verran.

Tämänhetkisen protokollan mukaiseen solunulkoisten vesikkeleiden/eksosomien karakterisointiin tarvitaan alkuperäistä eksosomieristyksen preparaattia vain 24  $\mu\text{l}$  tarkasti laskettuna (kokonaismäärä noin 200  $\mu\text{l}$ ), ja tästä määrästä saadaan määritettyä kaikki protokollan mukaiset analyysit, sekä lisäksi EM-kuvannus, jota ei tässä työssä käsitelty/huomioitu. Esimerkiksi 30  $\mu\text{l}$ :n näyte riittää jo hyvin pitkälle. Näin ollen käyttötarkoituksesta riippuen pienempikin plasmamäärä kuin 500  $\mu\text{l}$  riittäisi lähtömääräksi.

Protokollaan tulee vielä NTA-analyysi ja vasta-aineleimaukset optimoida selvemmin, jotta protokollaa voidaan vaivatta käyttää analyysissä. Myös eksosomipreparaatin puhtauteen tulee kiinnittää huomiota, ja selvittää muun muassa seerumi albumiinin läsnäolon vaikutus jatkotutkimuksien kannalta, häiritseekö se tutkimuksen jatkamista preparaattilla.

Valmiin protokollan avulla voidaan suorittaa tieteelliseen tutkimukseen ja julkaisuun kelpaava karakterisointi. Kun lopullinen optimointi on saatu tehtyä, voi tutkimusta jatkaa ja vertailla proteiiniprofiileja naiivi-, TBI- ja SHAM-eläinten välillä. Näin voitaisiin epilepsiaryhmän hypoteesin mukaan nähdä eksosomiprofiilissa selkeä ero SHAM- ja TBI-eläimien eksosomiprofiilissa, verrattuna naiviin ja toisiinsa. Näin ollen voidaan jatkossa kartoittaa proteiiniprofiilin muutoksista ja konsentraatiomuutoksista mahdollisia biomarkkereita traumaperäisen epilepsian syntymiselle.

## Lähteet

- 1 Käypähoito. 2003. Aivovammat. Käypä hoito –suositus. Verkkojulkaisu. <<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suosituksset/suositus?id=hoi18020#suositus>>. Päivitetty 16.12.2008. Luettu 29.10.2015
- 2 Varsinais-Suomen Sairaanhoidopiiri. 2010. Alkuvaiheen tietopaketti aivovammoista. Verkkodokumentti. <<http://ohjepankki.vsshp.fi/fi/6235>>. Päivitetty 6/2015. Luettu 29.10.2015
- 3 Itä-Suomen yliopisto. 2015. Epilepsy Research Laboratory. Verkkoesittely. <<http://www2.uef.fi/fi/aivi/neuro/epilepsy>>. Luettu 29.10.2015.
- 4 International Society for Extracellular Vesicles. 2011. Constitution of the International Society for Extracellular Vesicles. Verkkojulkaisu. <<http://isev.org/isev-constitution/>>. Päivitetty 19.12.2013. Luettu 29.10.2015
- 5 Lötvall, J., Hill, A.F., Hochberg, F., Buzás, E.I., Di Vizio, D., Gardiner, C., Gho, Y.S., Kurochkin, I.V., et al. 2014. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. Verkkodokumentti. <<http://www.journalofextracellularvesicles.net/index.php/jev/article/view/26913/37731>>. Julkaistu 22.12.2014. Luettu 1.9.2015
- 6 Théry, C. 2011. Exosomes: secreted vesicles and intracellular communication. Verkkojulkaisu. <<http://f1000.com/prime/reports/b/3/15>>. Julkaistu 1.7.2011. Luettu 28.10.2015
- 7 Raposo, G. Stoorvogel, W. 2013. Extracellular vesicles: Exosomes microvesicles, and friends. <<http://jcb.rupress.org/content/200/4/373/F3.large.jpg>>. Julkaistu 18.2.2013. Luettu 30.10.2015
- 8 Valadi, H., Ekström, K. Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J. Lötvall, J.O. 2007. Exosome mediated transfer of mRNAs and micro RNAs as a novel mechanism of genetic exchange between cells. Verkkojulkaisu. <<http://www.nature.com/ncb/journal/v9/n6/pdf/ncb1596.pdf>>. Julkaistu 7.5.2007. Luettu 28.10.2015
- 9 Malvern Instruments Worldwide. 2015. NTA: Exosomes and Microvesicles – General. Verkkodokumentti. <<http://www.malvern.com/en/pdf/secure/WP150312NTAExosomesMicrovesGen.pdf>>. Luettu 1.9.2015
- 10 Haajanen, K., Pärssinen, R. & Suominen, I. 2012. Biogeeni, Ammatillista biokemiaa ja geenitekniikkaa. Suomi, Tampere: Juvenes Print – Suomen Yliopistopaino Oy

- 11 Abcam®. 2015. Anti-Flotilliini 1 antibody. Verkkodokumentti.  
<<http://www.abcam.com/Flotilliini-1-antibody-EPR6041-ab133497.pdf>>. Luettu 15.9.2015
  
- 12 Abcam®. 2015. Anti-CD9 antibody. Verkkodokumentti.  
<<http://www.abcam.com/cd9-antibody-epr2949-ab92726.html>>. Luettu 15.9.2015
  
- 13 Santa Cruz Biotechnology, Inc. 2015. Anti-Seerumi albumiini. Verkkodokumentti. <<http://datasheets.scbt.com/sc-46293.pdf>>. Luettu 15.9.2015
  
- 14 Santa Cruz Biotechnology, Inc. 2015. Anti-Kalneksiini, Verkkodokumentti.  
<<http://datasheets.scbt.com/sc-11397.pdf>>. Luettu 15.9.2015
  
- 15 Deighan, C. 2015. Getting the most out of your EV NTA measurements: Simple methods for dilution, concentration and sizing. Webinaari.  
<<https://www.brainshark.com/malvern/vu?pi=608393882&b=1&tx=492097&c1=22>>. Katsottu 9.9.2015
  
- 16 Griffiths, D. 2014. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) – A New View of Nanoparticle Characterization. Webinaari,  
<<https://www.brainshark.com/malvern/vu?pi=124201400&b=1&tx=492097&c1=22>>. Katsottu 9.9.2015
  
- 17 Wright, M. 2015. NTA Virtual Demonstration. Webinaari.  
<<https://www.brainshark.com/malvern/vu?pi=792851532&b=1&tx=492097&c1=2>>. Katsottu 9.9.2015
  
- 18 Exiqon. 2015. miRCURY® Exosome Isolation Kit. Verkko-ohjekirja.  
<<http://www.exiqon.com/ls/Documents/Scientific/exosome-kit-isolation-serum-plasma.pdf>>. Luettu 2.9.2015
  
- 19 Gibbons, J. 2014. Western Blot: Protein Transfer Overview. Verkkodokumentti.  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3978941/>>.3/2014. Luettu 30.10.2015
  
- 20 Hoefer. 2015. TE77XP, Semi-dry Blotter user manual. Verkko-ohjekirja.  
<<https://www.hoeferinc.com/media/PDFs/Manuals/TE70X-IMC0-English.pdf>>. Luettu 30.9.2015



## Characterization of Exosomes from rat plasma

### 1. Exosome extraction

Extract Exosomes from 500 ul of plasma according to your isolation kit manual. This protocol is made on the base of Exiqon miRCURY® Exosome Isolation Kit for serum and plasma, written by Exiqon.

(<http://www.exiqon.com/Is/Documents/Scientific/exosome-kit-isolation-serum-plasma.pdf>))

#### Notes prior to use

Before getting started please ensure that the centrifuge is run at room temperature and that the Thrombin has been resuspended in the Thrombin Buffer. Thaw samples on ice or at 4°C. Vortex Precipitation Buffer prior to use.

|                    |  |
|--------------------|--|
| Step 1             | Add 6 µL Thrombin (stock concentration of 500 U/mL) to 0.6 mL plasma, mix and incubate for 5 minutes at room temperature.  |
| Step 2             | Spin for 5 minutes at 10,000 x g.<br><b>Filter the whole supernatant through Millipore Millex 220 nm filter before continuing!</b>   |
| Step 3             | Transfer 0.5 mL of supernatant into a new 1.5 mL reaction vial.  |
| Step 4             | Add 200 µL Precipitation Buffer A and vortex for 5 seconds to mix.   |
| Step 5             | Incubate for 60 minutes at 4°C.* <b>* or overnight!</b>  |
| Step 6             | Spin for 5 minutes at 500 x g at room temperature.   |
| Step 7             | Remove supernatant completely and discard (or save for separate analysis). Briefly respin to collect and remove residual supernatant.  |
| Step 8             | Resuspend pellet by vortexing in 270 µL Resuspension Buffer ending up with ~300 µL final volume. For multiple samples use a 2 mL reaction vial vortex shaker for 5 to 15 minutes at room temperature.  |
| Step 9a            | Continue RNA extraction with the resuspended pellet using miRCURY™ RNA Isolation Kit – Biofluids (use protocol from appendix in this manual).  |
| Step 9b<br>Storage | The purified exosome sample may be stored at 4°C for up to 2 days or can be stored at -20°C prior to RNA isolation. In order to minimize the risk of RNase contamination we recommend proceeding directly with further downstream sample processing. |

\* Precipitation time can be extended e.g. overnight.

Store exosomes in -70 °C, in 30 ul aliquots, which are suitable for use for the whole protocol to follow.

## 2. Pierce™ Protein Assay

Protocol done as stated in Pierce™ Protein assay kit instructions.

[https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011430\\_Pierce\\_BCA\\_Protein\\_Asy\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf)

### Preparation of Standards and Working Reagent (required for both assay procedures)

#### A. Preparation of Diluted Albumin (BSA) Standards

Use Table 1 as a guide to prepare a set of protein standards. Dilute the contents of one Albumin Standard (BSA) ampule into several clean vials, preferably using the same diluent as the sample(s). Each 1mL ampule of 2mg/mL Albumin Standard is sufficient to prepare a set of diluted standards for either working range suggested in Table 1. There will be sufficient volume for three replications of each diluted standard.

**Table 1.** Preparation of Diluted Albumin (BSA) Standards

| Dilution Scheme for Standard Test Tube Protocol and Microplate Procedure (Working Range = 20-2,000µg/mL) |   |  |  |
|--|---|--|--|
| <u>Vial</u>  | <u>Volume of Diluent</u><br><u>(µL)</u> | <u>Volume and Source of BSA</u><br><u>(µL)</u> | <u>Final BSA Concentration</u><br><u>(µg/mL)</u> |
| A  | 0                                       | 300 of Stock                                   | 2000   |
| B  | 125                                     | 375 of Stock                                   | 1500   |
| C  | 325                                     | 325 of Stock                                   | 1000   |
| D  | 175                                     | 175 of vial B dilution                         | 750  |
| E  | 325                                     | 325 of vial C dilution                         | 500  |
| F  | 325                                     | 325 of vial E dilution                         | 250  |
| G  | 325                                     | 325 of vial F dilution                         | 125  |
| H  | 400                                     | 100 of vial G dilution                         | 25   |
| I  | 400                                     | 0  | 0 = Blank  |
| Dilution Scheme for Enhanced Test Tube Protocol (Working Range = 5-250µg/mL)                             |   |  |  |
| <u>Vial</u>  | <u>Volume of Diluent</u><br><u>(µL)</u> | <u>Volume and Source of BSA</u><br><u>(µL)</u> | <u>Final BSA Concentration</u><br><u>(µg/mL)</u> |
| A  | 700                                     | 100 of Stock                                   | 250  |
| B  | 400                                     | 400 of vial A dilution                         | 125  |
| C  | 450                                     | 300 of vial B dilution                         | 50   |
| D  | 400                                     | 400 of vial C dilution                         | 25   |
| E  | 400                                     | 100 of vial D dilution                         | 5  |
| F  | 400                                     | 0  | 0 = Blank  |

#### B. Preparation of the BCA Working Reagent (WR)

1. Use the following formula to determine the total volume of WR required:

$$(\# \text{ standards} + \# \text{ unknowns}) \times (\# \text{ replicates}) \times (\text{volume of WR per sample}) = \text{total volume WR required}$$

Example: for the standard test-tube procedure with 3 unknowns and 2 replicates of each sample:

$$(9 \text{ standards} + 3 \text{ unknowns}) \times (2 \text{ replicates}) \times (2\text{mL}) = 48\text{mL WR required}$$

**Note:** 2.0mL of the WR is required for each sample in the test-tube procedure, while only 200µL of WR reagent is required for each sample in the microplate procedure.

2. Prepare WR by mixing 50 parts of BCA Reagent A with 1 part of BCA Reagent B (50:1, Reagent A:B). For the above example, combine 50mL of Reagent A with 1mL of Reagent B.

**Note:** When Reagent B is first added to Reagent A, turbidity is observed that quickly disappears upon mixing to yield a clear, green WR. Prepare sufficient volume of WR based on the number of samples to be assayed. The WR is stable for several days when stored in a closed container at room temperature (RT).

### Microplate Procedure (Sample to WR ratio = 1:8)

1. Pipette 25µL of each standard or unknown sample replicate into a microplate well (working range = 20-2000µg/mL) (e.g., Thermo Scientific™ Pierce™ 96-Well Plates, Product No. 15041).

**Note:** If sample size is limited, 10µL of each unknown sample and standard can be used (sample to WR ratio = 1:20). However, the working range of the assay in this case will be limited to 125-2000µg/mL.

2. Add 200µL of the WR to each well and mix plate thoroughly on a plate shaker for 30 seconds.
3. Cover plate and incubate at 37°C for 30 minutes.

If 562nm measurements are desired, increase the incubation time to 2 hours.

- Increasing the incubation time or ratio of sample volume to WR increases the net 562nm measurement for each well and lowers both the minimum detection level of the reagent and the working range of the assay. As long as all standards and unknowns are treated identically, such modifications may be useful.
5. Subtract the average 562nm absorbance measurement of the Blank standard replicates from the 562nm measurements of all other individual standard and unknown sample replicates.
  6. Prepare a standard curve by plotting the average Blank-corrected 562nm measurement for each BSA standard vs. its concentration in µg/mL. Use the standard curve to determine the protein concentration of each unknown sample.

**Note:** If using curve-fitting algorithms associated with a microplate reader, a four-parameter (quadratic) or best-fit curve will provide more accurate results than a purely linear fit. If plotting results by hand, a point-to-point curve is preferable to a linear fit to the standard points.

Pierce Biotechnology  
3747 N. Meridian Road

PO Box 117  
Rockford, IL 61105 USA

(815) 968-0747  
(815) 968-7316 fax

[thermofisher.com/techresources](http://thermofisher.com/techresources)

Regarding the samples, make three samples accordingly

A: 3 µl of eksosome sample + 27 µl fresh PBS

B: 5 µl of sample A + 25 µl fresh PBS

C: 5 µl of sample B + 25 µl fresh PBS

Use 25 µl each according to the protocol.

Calculate protein concentration by counting back with the dilution factor.

## 3. SDS-PAGE

### Prepare beforehand

#### 0,5 M Tris-HCl, pH 6.8

M<sub>Tris</sub> = 12,1 g

Dilute into approximately 150 ml DD H<sub>2</sub>O, adjust pH to 6.8 with 37% HCl, then add DD H<sub>2</sub>O to reach total volume of 200 ml.

**1,5 M Tris, pH 8.8**

$M_{\text{Tris}} = 36,3 \text{ g}$

Dilute into approximately 150 ml DD H<sub>2</sub>O, adjust pH to 8.8 with 37% HCl, then add DD H<sub>2</sub>O to reach total volume of 200 ml.

**10 % (w/v) SDS (Read Safety Datasheet!)**

$M_{\text{SDS}} = 50 \text{ g}$

Dilute into 500 ml DD H<sub>2</sub>O.

**10 % Ammoniumpersulfate APS (Read safety datasheet!)**

$M_{\text{APS}} = 65 \text{ mg}$

Dilute into 650 µl sterilized H<sub>2</sub>O, adjust pH with 37% HCl, then add DD H<sub>2</sub>O to reach total volume of 200 ml.

Prepare just before use.

**12% SDS-PAGE gels**

Separating gel (4 gels) 12% acrylamide

|  |         |
|--|---------|
| H <sub>2</sub> O                               | 12,8 ml |
| Acrylamide/Bis-Acrylamide (30%/0.8% w/v)       | 16 ml   |
| 1.5 M Tris                                     | 10,4 ml |
| 10 % SDS                                       | 400 µl  |
| 10 % APS                                       | 400 µl  |
| TEMED  | 40 µl   |
| ADD APS AND TEMED JUST BEFORE CASTING THE GELS |         |

Carefully pipet sterile H<sub>2</sub>O on each gels surface to prevent drying.

## Stacking gel (4 gels)

|  |          |
|--|----------|
| H <sub>2</sub> O                               | 12 ml    |
| Acrylamide/Bis-Acrylamide (30%/0.8% w/v)       | 2,680 ml |
| 0.5 M Tris                                     | 5 ml     |
| 10 % SDS                                       | 200 µl   |
| 10 % APS                                       | 200 µl   |
| TEMED  | 20 µl    |
| ADD APS AND TEMED JUST BEFORE CASTING THE GELS |          |

Allow the Separating gel to polymerize at least 2 hours before casting the stacking gel on top. Dry the separating gels surfaces carefully before casting the stacking gel. Leave gels to polymerize for at least 1 hour, then open the caster and wash each gel with DD H<sub>2</sub>O and a very soft brush. Place gels in wet paper (separately) and place them into a sealed plastic bag and store in +4 °C.

**Preparing SDS-PAGE samples:**

Using Pierce™ Protein Assay results, calculate the amount of PBS needed for appropriate dilution needed, as followed:

$$C_{\text{extracted exosomes}} * V_{\text{extracted exosomes}} = C_{\text{SDS-PAGE sample}} * V_{\text{SDS-PAGE sample}}$$

$$\rightarrow V_{\text{SDS-PAGE sample}} = (C_{\text{extracted exosomes}} * V_{\text{extracted exosomes}}) / C_{\text{SDS-PAGE sample}}$$

$C_{\text{extracted exosomes}}$  = concentration measured with Pierce™

$C_{\text{SDS-PAGE sample}}$  = 1,0-1,2 µg/µl depending on desired concentration

$V_{\text{extracted exosomes}}$  = 20 µl

Note that the final volume of the SDS-PAGE sample, must be divided by four, and replace ¼ of the final volume with SDS 4x sample buffer. The amount of sample buffer must be deducted from the PBS amount (final volume – 20 µl – sample buffer amount = amount of PBS). Brief vortex and incubate samples +98 °C for 10 minutes.

## **RUNNING SDS-PAGE**

Prepare beforehand 10 x running buffer as followed:

30 g Trisma  
144 g Glycine  
10 g SDS

Dilute all to final volume of 1l DD H<sub>2</sub>O

For every run prepare 1 x Running Buffer (100ml 10x RB / 900ml DD H<sub>2</sub>O )

Place gels (max 2 per run) onto the current SDS-PAGE running chamber and fill it on both sides with 1 x RB so that all electrodes are submerged and gel wont dry out.

Pipet 5 ul of marker and 10 µl of each sample as desired.

Run for 1 h 20 min 200 V.

During the run prepare for Western Blot

## **4. Western Blot**

Based on teching material at Univeristy of Jyväskylä.

### **Prepare beforehand**

#### **Anode I BUFFER      0.3 M Tris pH 10**

18,2 g of TRIS diluted into approximately 300 ml DD H<sub>2</sub>O and adjust pH to 10 with HCl.  
After this add water to reach end volume of 400 ml.

**! This solution will need 20% v/v MeOH added before use, Add only to the amount needed per run (approx. 50 ml) !**

#### **Anode II BUFFER      025 mM Tris pH 10**

1,5 g of TRIS diluted into approximately 300 ml DD H<sub>2</sub>O and adjust pH to 10 with HCl.  
After this add water to reach end volume of 400 ml.

**! This solution will need 20% v/v MeOH added before use, Add only to the amount needed per run (approx. 50 ml) !**

**Cathode BUFFER      25 nM Tris, 40 mM 6-aminohexanoic acid pH 9**

2,7 g of TRIS and 4,7 g aminohexanoic acid diluted into approximately 300 ml DD H<sub>2</sub>O and adjust pH to 10 with HCl. After this add water to reach end volume of 720 ml.

**! This solution will need 20% v/v MeOH added before use, Add only to the amount needed per run (approx. 50 ml) !**

**10 x TEN**

Trizma base 60,55 g

EDTA 36,65 g

NaCl 87,65 g

HCl (37%) ~65 ml pH 7.4

DD H<sub>2</sub>O 1000 ml (final volume after pH adjustment!!)

**STERILIZE BEFORE USE!!!**

**1 x TEN + 1,0 % TWEEN 20**

445 ml sterile H<sub>2</sub>O

50 ml 10 x TEN

5 ml TWEEN 20

**1 x TEN + 0,1 % TWEEN 20**

4 ml sterile H<sub>2</sub>O

50 ml 10 x TEN

500 µl TWEEN 20

**Protein Transfer**

While SDS-PAGE is running prepare all 3 buffers by adding 20% v/v MeOH.

Cut out 6 pieces of filter paper, slightly smaller than the gel.

Cut out 1 PVDF membrane, slightly smaller than the gel.

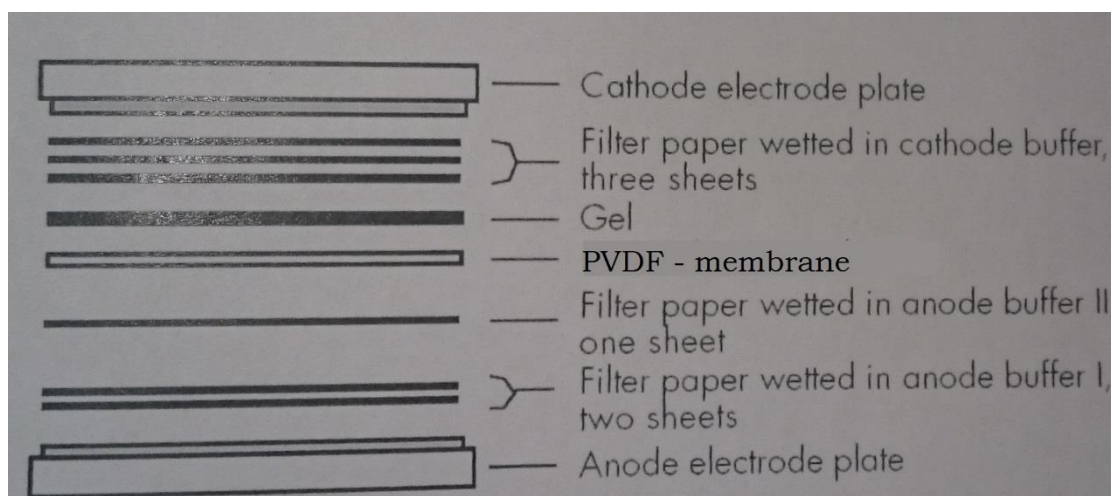
Prepare for transfer as followed

Place gel and 3 filter sheets into CATHODE BUFFER, for at least 15 min.

Activate membrane by soaking it in MeOH for 15 s, then transfer to dd H<sub>2</sub>O for 20 s and finally place the membrane and 1 filter into ANODE BUFFER II for at least 5 min.

Place the two remaining filter papers into ANODE BUFFER I for at least 30 s.

Assembly stack onto transfer equipment as pictured:



Run parameters 75 mA, 1h.

### Immunodetection

- **BLOCKING:** After Transfer place membrane into 1 x TEN + 1% TWEEN 20 for 2h RT or +4 ° o/n on a platform shaker.
- **1° ANTIBODY:** Dilute the antibody into 1 x TEN + 1% TWEEN 20. Incubate membrane in antibody for 1h RT or +4 ° o/n on a platform shaker
- Discard antibody and perform 6 x 5 min washes with 1 x TEN + 0,1 % TWEEN 20, change buffer in every wash. RT and on platform shaker
- **2° ANTIBODY:** Dilute the antibody into 1 x TEN + 1% TWEEN 20. Incubate membrane in antibody for 1h RT
- Discard antibody and perform 6 x 5 min washes with 1 x TEN + 0,1 % TWEEN 20, change buffer in every wash. RT and on platform shaker
- If not detected straight away, store membrane in or +4 ° on a platform shaker.
- For detection develop the blot with available chemiluminescence substrates (according to kit instructions). In current use Thermo Fischer Scientific
- SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (34080), preparing substrate 1:1 and allow substrate to devolope 1-2 min before detection.

Detect Membrane with Syngene GBOX (Snelmannia) with open iris and 1-3 min detection time. Remember to take a whitelight picture of the marker before detecting chemilumenesence and to adjust focus. Therefore use the manual capturing program.

## 5. NANO SIGHT

Start by cleaning the sample tubes and chmber by insertin 2-5 ml of PBS. If more than 3 particles are visible, take background picture to reduce background effect on the sample.



Dilute your sample 2 ul sample of exosomes / 8000 ul FRESH PBS

Set Camera Level to CL 15

Capture: 60s videos x 3 ( = 4 videos)

Syringeload 60

After the videos, choose SDT 3

Save all information and videos if possible.

Dilute sample with fresh PBS if needed.